

A Importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 108

A importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração

*Cynthia Maria Borges Damasceno
Sylvia Moraes de Sousa
Roberto Willians Noda
Rafael Augusto da Costa Parrella
Robert Eugene Schaffert
Jurandir Vieira Magalhães*

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo

Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira

Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Supervisão editorial: Adriana Noce

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Alexandre Esteves Neves

Editoração eletrônica: Alexandre Esteves Neves

Foto da capa: Olímpio Filho

1ª edição

1ª impressão (2010): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

A importância da lignina para a produção de etanol de Segunda geração / Cynthia Maria Borges Damasceno .. [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

35 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 108).

1. Melhoramento genético. 2. Bioenergia. 3. Biomassa. 4. Bio-combustível. I. Damasceno, Cynthia Maria Borges. II. Série.

CDD 676.5 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Autores

Cynthia Maria Borges Damasceno

Bióloga, Ph.D. em Fitopatologia (Biologia Molecular), Pesquisadora em Biologia Molecular de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, cynthia@cnpms.embrapa.br

Sylvia Moraes de Sousa

Bióloga, Ph.D. em Genética e Melhoramento (Biologia Molecular), Pesquisadora em Biologia Molecular de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, smsousa@cnpms.embrapa.br

Roberto Willians Noda

Biólogo, Ph.D. em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Pesquisador em Bioinformática da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, roberto.noda@cnpms.embrapa.br

Rafael Augusto da Costa Parrella

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Pesquisador em Melhoramento de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, parrella@cnpms.embrapa.br.

Robert Eugene Schaffert

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador em Melhoramento de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, schaffert@cnpms.embrapa.br

Jurandir Vieira Magalhães

Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Ciência do Solo - Genética Molecular, Pesquisador em Genética Molecular de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jurandir@cnpms.embrapa.br

Sumário

Introdução	7
Produção de etanol de segunda geração	8
O melhoramento genético vegetal aplicado à produção de etanol.....	9
A composição da parede celular e a produção de bioenergia ...	10
O componente lignina	12
Manipulação dos genes envolvidos na síntese de lignina	14
Mutantes de lignina: <i>bm</i> e <i>bmr</i>	17
Perspectivas futuras para o melhoramento de culturas dedicadas à produção de bioenergia	20
Sorgo como fonte de biomassa para produção de bioenergia	21
Conclusões	23
Referências	23

A Importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração

Cynthia Maria Borges Damasceno

Sylvia Moraes de Sousa

Roberto Willians Noda

Rafael Augusto da Costa Parrella

Robert Eugene Schaffert

Jurandir Vieira Magalhães

Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque em um mundo em que a segurança energética e a sustentabilidade ganharam grande importância. Enquanto o Brasil apresenta uma matriz energética com 46% de fontes renováveis, os outros países em média utilizam apenas 15% desse tipo de energia, sendo assim muito mais dependentes de combustíveis fósseis (PLANO 2005). Grande parte do sucesso brasileiro se deve às fortes iniciativas na área de agroenergia, sendo que a cana-de-açúcar e os seus derivados constituem a segunda maior fonte de energia primária da matriz energética nacional. Apesar de a indústria sucroalcooleira do Brasil já existir há vários séculos, foi com o a implantação do ProÁlcool, em 1975, que esse setor se desenvolveu tecnologicamente, diminuindo nossa dependência por petróleo importado (NASS et al., 2007). Desde o início do ProÁlcool, a produção nacional de etanol aumentou cerca de trinta vezes. Além de ser o maior produtor de açúcar do mundo, o Brasil também é o segundo produtor de etanol, sendo os EUA os primeiros (NASS et al., 2007). Devido ao grande sucesso com a produção de etanol como combustível, o Brasil se tornou referência mundial na área de energia renovável. Para manter esta posição de liderança, precisaremos investir em pesquisa e produção de fontes alternativas de energia, como a produção de etanol de segunda geração, ou a partir da biomassas-

sa vegetal. Segundo a FAO (2005), além do aumento na produção de biocombustíveis, o aumento da utilização de biomassa para energia poderá levar ao desenvolvimento econômico e à diminuição da pobreza pela geração de empregos e melhorias na vida das populações rurais.

Produção de etanol de segunda geração

A captura de energia solar por meio da fotossíntese é o processo que permite o armazenamento de energia sob a forma de polímeros constituintes da parede celular, dentre eles a celulose, a hemicelulose, a pectina e a lignina. A energia estocada nesses polímeros pode ser liberada e utilizada de diversas maneiras, diretamente, por meio da combustão, ou pela bioconversão em compostos com propriedades combustíveis. A produção de biocombustíveis lignocelulósicos envolve a produção e a coleta de biomassa, despolimerização dos polissacarídeos da parede celular (celulose e hemicelulose) em açúcares simples e fermentáveis, pelos processos de pré-tratamento e sacarificação, e conversão de açúcares simples em biocombustíveis pela fermentação. O pré-tratamento é um processo cujo principal objetivo é promover a hidrólise da biomassa. O aumento e/ou a extensão da hidrólise está relacionada ao tipo de agente químico/físico utilizado. Isso é obtido pelo afrouxamento da estrutura da parede celular, solubilização da hemicelulose e redução da cristalinidade da celulose. Ao mesmo tempo, busca-se minimizar a formação de produtos de degradação, tais como furfurais e o ácido acético, que podem interferir na atividade enzimática durante os processos de sacarificação e fermentação para produção de etanol. Os métodos atuais de pré-tratamento mais utilizados para remover a lignina e aumentar o acesso de enzimas sacarificadoras à celulose incluem a moagem simples da biomassa seguida por explosão de fibras a vapor, ou pelo tratamento da biomassa com amônia ou ácidos/bases diluídos ou concentrados (YANG; WYMAN, 2004; MOSIER et al., 2005).

Devido ao interesse relativamente recente por combustíveis não fossilizados, as etapas do processo de produção de biocombustíveis a partir

de biomassa ainda estão em fase inicial de otimização (RAGAUSKAS et al., 2006). Não apenas os processos de pré-tratamento físico-químico terão de passar por melhorias tecnológicas, mas também inovações serão necessárias no desenvolvimento de enzimas celulolíticas mais eficientes e de menor custo (ESCOVAR-KOUSEN et al., 2004). Além disso, linhagens de levedura capazes de fermentar ao mesmo tempo hexoses e pentoses (HO et al., 1998) deverão ser desenvolvidas, a fim de aumentar a eficiência do pré-tratamento e tornar o processo de produção de biocombustíveis de segunda geração economicamente viável em escala industrial.

Como o pré-tratamento é uma das etapas mais caras na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (WYMAN et al., 2005), a interação entre os carboidratos da parede celular e a lignina deve ser reduzida para que haja conversão biológica da celulose em açúcares fermentáveis. Dessa forma, a seleção ou engenharia genética objetivando a produção de culturas vegetais dedicadas ganha grande importância. Nesses materiais, a parede celular sofre alterações de forma que a celulose fique mais acessível a enzimas hidrolíticas, sendo também desejável a presença de baixos teores de lignina e/ou menor cristalinidade da fibra de celulose. Em conjunto, essas propriedades levarão à produção economicamente viável de biocombustíveis (YACOBUCCI; SCHNEPF, 2007). Com esse objetivo, várias linhas de pesquisa têm focado na manipulação e na introdução de genes relacionados às vias biossintéticas dos principais polímeros da parede celular, em especial da lignina, para obtenção de materiais mais adaptados aos processos envolvidos na produção de etanol (DAUWE et al., 2007, CHEN; DIXON, 2007).

O melhoramento genético vegetal aplicado à produção de etanol

Uma área que oferece grande potencial, mas que permanece pouco explorada, é o melhoramento para obtenção de variedades com características específicas para o processamento da biomassa visando à produção de biocombustíveis. Dentre as características que devem

ser avaliadas em culturas dedicadas à produção de bioenergia estão a taxa de crescimento, a resposta à competição por luz, o hábito de ramificação, a espessura de caule/colmo e a composição de parede celular. Essas características poderão ser dissecadas geneticamente, especialmente para as espécies cuja sequência genômica já se encontra disponível. Acredita-se que a maximização da produção de biomassa por unidade de área plantada será um dos principais focos dos programas de melhoramento voltados à produção de bioenergia, para conseguir minimizar o uso de área cultivável. As alterações nas proporções e estruturas dos vários polímeros que constituem a parede celular também constituirão um importante foco adicional para a produção de culturas dedicadas à bioenergia, uma vez que um dos principais problemas para a conversão de biomassa para açúcares fermentáveis é a sacarificação da celulose e hemicelulose (HILL et al., 2006).

A composição da parede celular e a produção de bioenergia

A celulose é o biopolímero mais abundante do planeta e o principal constituinte da parede celular das células vegetais (BOERJAN et al., 2003). De fato, o material seco remanescente de plantações, a madeira e o bagaço, são constituídos basicamente de parede celular. A parede celular é uma estrutura complexa na qual as microfibras de celulose estão inseridas em uma matriz de hemicelulose, pectina, proteínas e compostos fenólicos, como a lignina. As proporções relativas dos principais componentes da parede variam dependendo do material vegetal (REDDY; YANG, 2005). A celulose constitui-se de uma cadeia de moléculas de glicose, ligadas umas às outras por ligações glicosídicas do tipo (1-6), enquanto a hemicelulose, o segundo constituinte de biomassa em abundância, constitui uma família de polissacarídeos, compostos de monossacarídeos de 5 ou 6 carbonos, contendo ligações glicosídicas do tipo (1-6) e (1-4). A hemicelulose interconecta as microfibras de celulose aos demais constituintes da parede celular, o que proporciona força estrutural a ela (VAN WYK, 2001). Finalmente, a lignina é um

polímero de unidades fenilpropanóides altamente resistente à degradação, resultando disso o seu papel na manutenção da integridade física da parede celular.

Há dois tipos de parede celular segundo Carpita e Gibeaut (1993). O tipo I é comum em dicotiledôneas e monocotiledôneas não pertencentes à subclasse Commelinidae, e contém uma alta proporção de pectina e proteínas, e sua fração de hemicelulose contém xiloglucanos. A parede celular tipo II está presente em monocotiledôneas da subclasse Commelinidae, grupo que inclui as gramíneas, e contém concentrações relativamente menores de pectina e proteínas, sendo que a fração hemicelulósica consiste basicamente de glucuro-arabinoxilanos. Todas as células vegetais possuem uma parede celular primária, enquanto a parede secundária está limitada a órgãos e tecidos especializados como raízes, o tecido vascular, necessário para o transporte de água (xilema), e o tecido de suporte (madeira), rico em fibras. A parede secundária é rica em lignina que, além de oferecer rigidez à célula, também é importante na defesa contra patógenos e pragas. A habilidade da lignina em resistir à degradação pode ser atribuída à estrutura singular desse polímero que, ao contrário da celulose, não é linearmente constituído de monômeros idênticos que se repetem. Esta é composta de um número de subunidades distintas, ou monolignóis, cuja abundância pode variar entre espécies, indivíduos, ou mesmo o tipos de células (RALPH et al., 2004). Os monolignóis mais comuns são adicionados ao polímero de lignina formando os resíduos de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G), e siringil (S), os quais são secretados no apoplasto e então depositados na parede celular por peroxidases e lacases extracelulares (RALPH et al., 2004, HOSOKAWA et al., 2001). A parede celular das espécies de gramíneas também difere da parede de outras espécies em termos da composição da lignina (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Apesar da composição da lignina em termos de unidades (guaiacil e siringil) ser similar entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, as gramíneas também contêm uma pequena mas significativa porcentagem da unidade hidroxifenil (H, 4-15%), que é encontrada apenas em traços na lignina proveniente de dicotiledôneas (GRABBER et al., 2004).

Além disso, ao contrário das dicotiledôneas, a lignina de gramíneas contém quantidades substanciais de ácido ferúlico e cumarílico, que são esterificados e eterificados na parede. Acredita-se que o ácido ferúlico é responsável pela interação entre lignina e os polissacarídeos presentes na parede, além de ser um dos inibidores do processo de sacarificação da celulose e hemicelulose e da fermentação de açúcares para produção de etanol (HATFIELD et al., 1994).

A lignina pode afetar o processo de sacarificação da biomassa em açúcares fermentáveis de duas maneiras: ela pode adsorver irreversivelmente as enzimas hidrolíticas, bloqueando sua ação na celulose (CHERNOGLAZOV et al., 1988; CONVERSE, 1993; PALONEN et al., 2004) e, por ser hidrofóbica, pode também prevenir que a fibra celulósica se entumeça, o que diminui a área de superfície acessível às enzimas (MOONEY et al., 1998). Isso resulta na necessidade de maiores concentrações das enzimas para o processamento da biomassa, tornando-o economicamente inviável. Chang e Holtzaple (2000) identificaram que a remoção da lignina é um fator dominante para melhorar a digestibilidade enzimática da biomassa. De fato, Draude et al. (2001) mostraram que a remoção de 67% da lignina da polpa da madeira foi suficiente para aumentar em até duas vezes a taxa de hidrólise da celulose, e aumentar em quase três vezes os açúcares resultantes do processo de conversão, sendo que resultados similares também foram obtidos em biomassa de milho (YANG; WYMAN, 2004). As propriedades físico-químicas da lignina e as limitações que ela pode causar no processo de conversão da biomassa fazem da sua biossíntese um ponto chave de controle para a obtenção de materiais com maior eficiência para produção de biocombustíveis.

O componente lignina

A habilidade de sintetizar lignina foi crucial para a evolução das plantas terrestres a partir de seus ancestrais aquáticos, uma vez que este composto fornece a integridade estrutural necessária às células vegetais e permite às plantas conduzir água através de um sistema vascular, formado pelo xilema, além de defendê-las eficazmente con-

tra patógenos e pragas (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996; KENRICK; CRANE 1997).

Devido à sua importância econômica, a lignina tem sido extensivamente estudada. Na década passada, pesquisadores foram capazes de manipular o conteúdo e a composição de lignina em uma variedade de plantas utilizando o melhoramento e a engenharia genética (BOUDET et al., 2003; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Esses estudos resultaram em plantas transgênicas mais eficientes em produção de papel ou digestibilidade de forragens, além de proporcionar um melhor entendimento da via biossintética da lignina (BOERJAN et al., 2003; HUMPHREYS; CHAPPLE, 2002). Embora tais tentativas tenham demonstrado bons resultados ao diminuir o conteúdo total de lignina (BOERJAN et al., 2003; BAUCHER et al., 2003), muitos estudos também resultaram em plantas com características indesejáveis, como o nanismo, resultando em alguns casos no colapso do xilema no aumento de suscetibilidade a fungos (JONES et al., 2001; FRANKE et al., 2002). Portanto, um dos grandes desafios nesta área é exatamente o de simplificar a remoção de lignina do material de biomassa ou diminuir seus efeitos na sacarificação da celulose, e concomitantemente manter teores mínimos de lignina para garantir as propriedades agrônomicas das culturas.

A biossíntese dos monolignóis (p-hidroxifenil (H), guaiacil (G), and sirin-gil (S)), está ligada à via dos fenilpropanóides. Atualmente, há um consenso de que dez enzimas são necessárias para a biossíntese dos monolignóis: fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), 4-cumarato coenzima A ligase ou hidroxicinamoil CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA: shikimato hidroxicinamoil transferase (HCT), 4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3'H), cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT), hidroxicinamoil CoA redutase (CCR), ferulato 5-hidroxilase (F5H), cafeato/5-hidroxiferulato O-metiltransferase (COMT) e cinamil álcool desidrogenase (CAD). Além disso, a polimerização da lignina, por meio de catálise por peroxidases (PER) e lacases (LAC), ocorre na parede celular (BOERJAN et al., 2003) (Figura 1A).



Como mencionado anteriormente, melhoristas têm tentado aumentar a digestibilidade de culturas para forragem utilizadas para alimentação animal. As soluções para aumentar digestibilidade sem afetar outras características varietais importantes são as de obter

materiais-elite com níveis de celulose e lignina modificados. Materiais contendo mais celulose e/ou menos lignina, ou com a composição de lignina modificada, têm maior digestibilidade animal. Por estas mesmas razões estes materiais têm grande potencial para apresentar maior eficiência de conversão em bioreatores (GRESSEL, 2008; BARRIÈRE et al., 2004; GRESSEL; ZILBERSTEIN, 2003). Para cada unidade de porcentagem a menos de lignina, duas a quatro vezes mais celulose podem se tornar disponíveis para conversão em açúcares fermentáveis (GRESSEL, 2008). Muitos estudos de engenharia genética visando ao melhoramento da digestibilidade de forragens focaram na regulação negativa dos genes envolvidos na via biossintética da lignina. Em geral, estes estudos concluíram que plantas nas quais genes cujas proteínas atuam no começo da via dos monolignóis, tais como *PAL*, *C4H*, *HCT* e *C3'H*, foram superexpressos, apresentaram redução do conteúdo de lignina. Em contraste, a regulação negativa de *F5H* ou *COMT*, cujas proteínas atuam em uma via ramificada convertendo guaiacil (G) para siringil (S), reduz significativamente a razão S/G mas apresenta pouco efeito no conteúdo de lignina (ELKIND et al., 1990; SEWALT et al., 1997, HE et al., 2003, REDDY et al., 2005, SHADLE et al., 2007). Uma menor razão de lignina S/G parece estar relacionada com uma maior liberação de xilose após hidrólise ácida, como reportado para a árvore álamo no estudo de Davison et al. (2006). Neste estudo, que focou na variação natural de lignificação existente em álamo, cinco genótipos contrastantes apresentaram diferentes níveis de eficiência em sacarificação da biomassa. Um deles, com baixo conteúdo de lignina e também baixa razão S/G, liberou a maior quantidade de xilose após hidrólise ácida, enquanto outro genótipo apresentando maior conteúdo de lignina e razão S/G liberou a menor quantidade de xilose. A tabela 1 apresenta um resumo dos diversos experimentos feitos com o intuito de aumentar a digestibilidade da biomassa produzindo-se plantas transgênicas com regulação negativa dos genes envolvidos na síntese de lignina.

Tabela 1. Quantificação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina e seus efeitos no conteúdo e composição de lignina e digestibilidade da forragem (modificada de Li et al., 2008). (↓: diminuição; ↑: aumento).

Gene regulado negativamente	Espécie	Conteúdo de lignina	Composição de lignina (resíduos G, H e S)	Digestibilidade	Referências
<i>PAL</i> ↓	Tabaco	Reduzido	Razão S/G ↑	Aumentou	Elkind et al. (1990), Sewalt et al. (1997)
<i>C4H</i> ↓	Alfafa	Reduzido	Razão S/G ↓	Aumentou	Reddy et al. (2005)
<i>HCT</i> ↓	Alfafa	Reduzido	H ↑	Aumentou	Shadle et al. (2007)
<i>C3'H</i> ↓	Alfafa	Reduzido	H ↑	Aumentou	Reddy et al. (2005)
<i>CCoAOMT</i> ↓	Alfafa	Reduzido	Razão S/G ↑	Aumentou	Guo et al. (2001a,b)
<i>F5H</i> ↓	Alfafa	Sem alteração	Razão S/G ↓	Sem alteração	Reddy et al. (2005)
<i>COMT</i> ↓	Tabaco	Sem alteração	Razão S/G ↓	Aumentou	Vailhe et al. (1996)
<i>COMT</i> ↓	Tabaco	Reduzido	Razão S/G ↑	Aumentou	Sewalt et al. (1997)
<i>COMT</i> ↓	Alfafa	Reduzido	Razão S/G ↓	Aumentou	Guo et al. (2001a,b)
<i>COMT</i> ↓	Milho	Reduzido	Razão S/G ↓	Aumentou	He et al. (2003)
<i>CAD</i> ↓	Tabaco	Sem alteração	Razão S/G ↓	Aumentou	Vailhe et al. (1996)
<i>CAD</i> ↓	Alfafa	Sem alteração	Razão S/G ↓	Aumentou	Baucher et al. (1999)

Devido ao fato de a maioria dos trabalhos na área de biossíntese de lignina terem sido feitos com o objetivo de melhorar a qualidade de forragens, apenas alguns exemplos se mostram direcionados especificamente para a melhora da produção de biocombustíveis. Um destes exemplos é o trabalho de Chen e Dixon (2007), que analisaram a digestibilidade da biomassa em seis linhas transgênicas de alfafa após tratamento ácido e hidrólise enzimática. Cada linha transgênica apresentava regulação negativa para um dos seguintes genes: *C4H*, *HCT*, *C3'H*, *CCoAOMT*, *F5H* e *COMT* e foram utilizadas previamente em estudos de digestibilidade de forragens (CHEN et al., 2006). Os autores verificaram que havia diferenças marcantes na eficiência de sacarificação de amostras de parede celular pré-tratadas com ácido. Entre as linhagens transgênicas, as que apresentavam menor expressão dos genes *C3'H* e *HCT* associaram-se à sacarificação enzimática com o dobro de eficiência quando comparadas ao controle. Chen et al. (2006) já haviam constatado que estas duas linhagens apresentavam um aumento no acúmulo de lignina rica em resíduos p-hidroxifenil (lignina H), mas o conteúdo total de lignina era menor. De fato, mesmo sem a etapa de pré-tratamento ácido estas linhagens demonstraram eficiência superior na sacarificação enzimática quando comparadas aos controles pré-tratados com ácido. Estes resultados são similares aos obtidos em um estudo em que a parede celular de um mutante em *Arabidopsis* deficiente em *C3'H* (gene *ref8*) se mostrou mais suscetível à hidrólise enzimática do que indivíduos selvagens (FRANKE et al., 2002). A maior parte da pesquisa para desenvolvimento de culturas dedicadas à produção de energia foca na redução ou modificação do componente lignina (VERMERRIS et al., 2007; SATTLE et al., 2010). Em conjunto, os resultados atuais sugerem que a modificação genética da biossíntese de lignina pode facilitar o processamento da lignocelulose para produção de biocombustíveis.

Mutantes de lignina: *bm* e *bmr*

Anteriormente à obtenção de plantas transgênicas para genes da síntese de lignina, mutantes nesta via haviam sido descritos em milho e sorgo e denominados *brown midrib* devido à formação de tecido

vascular marrom-avermelhado nas folhas e colmos, fenótipo ligado a modificações da lignificação dos tecidos (Figura 1B). Por causa disso, estes mutantes tornaram-se modelos para estudos genéticos e bioquímicos do processo de lignificação em milho, sorgo e outras gramíneas. Enquanto quatro mutantes *brown midrib* em milho (*bm*) se originaram de mutações recessivas espontâneas, os mutantes *brown midrib* de sorgo (*bmr*) foram gerados por mutagênese química em sementes tratadas com dietil sulfato (PORTER et al., 1978), resultando em um total de 19 mutantes *bmr* descritos, embora o número de locos independentes afetados nestes mutantes seja bem menor. De fato, um estudo de alelismo feito por Saballos et al. (2008) demonstra que há na verdade 4 locos *bmr* em sorgo, correspondendo às mutações *bmr-2*, *bmr-6*, *bmr-12* e *bmr-19*. Apesar de pouco se saber sobre a natureza das mutações *bm* e *bmr*, variedades de milho, sorgo e híbridos de sorgo *bmr* com capim sudan têm sido cultivados comercialmente com sucesso como forragem, devido à sua maior digestibilidade (BARRIÈRE et al., 2004).

Em milho, comparações de silagem proveniente dos mutantes *bm-1*, *bm-2*, *bm-3*, *bm-4* confirmaram o baixo teor de lignina, mas o trabalho também ilustrou as especificidades bioquímicas de cada mutante para os níveis de p-coumarato, ferulato, e a razão dos monômeros S/G da lignina. Vários mutantes *bmr* em sorgo têm um conteúdo de lignina significativamente menor em colmos e folhas quando comparados às linhagens das quais eles se originaram. O gene *bmr-6*, que corresponde ao gene *bm-1* de milho, foi identificado e clonado, correspondendo ao gene *SbCAD2* que codifica a enzima cinamil álcool desidrogenase (*CAD*) (SABALLOS et al., 2009). No mutante *bm-1* de milho, a atividade deste gene foi reduzida em cerca de 60–70% na parte aérea da planta, enquanto a redução foi de 90–97% nas raízes (PROVAN et al., 1997; HALPIN et al., 1998). Saballos et al. (2009) identificaram 3 alelos mutantes para o gene *bmr-6*, sendo que um deles, o *bmr-6ref* apresenta uma transição C para T na posição 2800 do gene *SbCAD2*, a qual cria um códon de parada originando uma proteína truncada e inativa de 131 aminoácidos. Demonstrou-se que a lignina proveniente do mutante *bm-1* incorpora tanto coniferaldeído quanto sinapaldeído, como resultado da deficiência na atividade de CAD, um fenômeno pre-

viamente descrito para o mutante de sorgo *bmr-6* (JACQUET, 1997). Dentre os mutantes *bmr*, as reduções mais significativas nos níveis de lignina e maior digestibilidade se encontram nos mutantes *bmr-12* e *bmr-18*. Estudos demonstraram que a digestibilidade *in vitro* da biomassa destes mutantes foi significativamente maior do que dos outros mutantes *bmr* ou da linhagem não mutante correspondente (PORTER et al., 1978). Testes de alelismo feitos por Bittinger et al. (1981) indicaram que *bmr-12* e *bmr-18* são alélicos, e diferem de *bmr-6*. O mutante correspondente em milho é o gene *bm-3*, que apresenta-se deficiente para a enzima cafeato/5-hidroxiferulato O-metiltransferase (COMT) (VIGNOLS et al., 1995). Bout e Vermerris (2003) clonaram os alelos *bmr-12*, *bmr-18* e *bmr-26* de sorgo e constataram que estes mutantes representavam diferentes formas alélicas do gene *COMT*, cada um contendo um codon de parada na sequência codificadora do gene. Uma vez que a enzima COMT é responsável pela conversão de 5-hidroxi-guaiacil (5-OH-G) em unidades siringil (S) da lignina, era esperado que mutantes para esta enzima apresentassem uma redução das unidades S e concomitantemente acúmulo de unidades 5-OH-G na lignina, o que foi verificado para *bm-3*, *bmr-12* e *bmr-18* (RALPH et al., 2001a, b; GAUDILLERE; MONTIES, 1989; LAPIERRE et al., 1988). Baseado nos dados de aumento de digestibilidade em mutantes *bmr* foi postulado que a característica *brown midrib* poderia aumentar a sacarificação enzimática. Este foi o caso para alguns dos mutantes, em especial *bmr-12*, que gerou mais glicose e xilose após a sacarificação enzimática do que o material controle (VERMERRIS et al., 2007). Atualmente, não há informações sobre quais genes são afetados nos mutantes *bm-2* e *bm-4* de milho e *bmr-2* e *bmr-19* de sorgo, sendo que nenhuma enzima da via biossintética dos monolignóis foi associada aos mesmos até o momento. Vermerris e Boon (2001) acreditam que estas mutações possam estar ligadas a genes de fatores de transcrição envolvidos com a regulação da deposição espaço-temporal da lignina na parede celular. Também é possível que tais mutações afetem o transporte dos monolignóis do citoplasma para a parede celular.

Recentemente, Dien et al. (2009) compararam linhas isogênicas de sorgo forrageiro com e sem os genes *bmr* quanto à eficiência do processo

de conversão da biomassa em glicose. Os autores verificaram que as linhas que apresentavam os genes *bmr-6* e *bmr-12* foram igualmente eficientes na redução do conteúdo de lignina e que houve um efeito aditivo na redução com o mutante duplo *bmr-6/bmr-12*. As amostras de sorgo sofreram pré-tratamento com ácido diluído antes de sacarificação da celulose por celulases. Quando comparada à linhagem não mutante, a liberação de glicose foi mais eficiente nos mutantes, com um aumento de 27%, 23% e 34% em termos de glicose liberada pelos mutantes *bmr-6*, *bmr-12* e o mutante duplo, respectivamente. Resultados similares foram obtidos quando o pré-tratamento foi feito com bases diluídas. Assim, os autores concluíram que a redução do conteúdo de lignina pode apresentar um impacto positivo na eficiência de conversão da biomassa em açúcares simples.

Perspectivas futuras para o melhoramento de culturas dedicadas à produção de bioenergia

Ao se comparar vários dos genomas de plantas disponíveis que podem auxiliar na obtenção de materiais para produção de bioenergia (tais como: álamo (*poplar*) - TUSKAN et al., 2006; arroz - YU et al., 2002; GOFF et al., 2002, *Arabidopsis* – THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000; sorgo - PATERSON et al., 2009, milho – SCHNABLE et al., 2009), juntamente com estudos de expressão gênica em larga escala, uma série de genes candidatos para o melhoramento de culturas dedicadas à bioenergia foram identificados (KALLURI et al., 2007; BUSOV et al., 2008). Dentre estes genes estão os envolvidos na síntese de celulose, hemicelulose e lignina, além de genes que influenciam características morfológicas de crescimento, como altura, número de ramos e espessura do caule (RAGAUSKAS et al., 2006). Além da estratégia de se usar homologia de sequências para identificação destes genes nos vários genomas de interesse, outras técnicas estão sendo usadas, como análise de mapeamento de locos de características quantitativas (QTL) em populações estruturadas e não estruturadas, e a análise de mutagênese em escala genômica acoplada a triagens feno-

típicas para características como composição geral da parede celular, digestibilidade e recalcitrância à sacarificação (FILICHKIN et al., 2007, DINUS et al., 2001).

No que diz respeito à análise de composição da parede celular, várias linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas nesta área para a otimização da obtenção de biocombustíveis a partir da biomassa. Por exemplo, um dos objetivos de alguns grupos de pesquisa é o de aumentar a concentração de celulose ou modificar sua estrutura, de forma que ela se torne menos cristalina e mais acessível à ação enzimática, o que poderia aumentar a produção de etanol. Plantas transgênicas da árvore álamo (*poplar*), super expressando o gene *CEL-1*, que codifica uma celulase do tipo endo-1,4-endoglucanase, demonstraram aumento na estatura, tamanho das folhas, espessura do caule e peso seco, além de maiores concentrações de celulose e hemicelulose quando comparadas às plantas controle (SHANI et al., 2004; OHMIYA et al., 2003). Outro exemplo é o de plantas transgênicas super expressando o domínio de ligação à celulose ou CBD (*cellulose-binding domain*), fusionado à enzima celulose sintase, cuja função é sintetizar celulose. Estas plantas cresceram mais rapidamente e acumularam mais biomassa do que as plantas controle de álamo (SHANI et al., 1999).

Sorgo como fonte de biomassa para produção de bioenergia

Dentre as espécies de plantas cultivadas, o sorgo tem grande potencial para se tornar uma das culturas dedicadas à produção de etanol devido à sua alta produção de biomassa seca, adaptabilidade a climas tropicais e temperados, baixos requerimentos de água e fertilizantes em comparação a outras espécies cultivadas. Além disso, a cultura do sorgo já apresenta sistemas de produção estabelecidos, além de grande diversidade genética que permite a seleção de materiais com alta tolerância a estresses abióticos, como ao alumínio, à seca e ao calor (MURRAY et al., 2008). É estimado que cultivares de sorgo dedicados à bioenergia tenham o potencial de produzir até 50 ton/ha de biomassa lignocelulósica.

sica seca por ano. Devido às características já descritas, outra grande vantagem de se utilizar o sorgo é a possibilidade de cultivo em áreas marginais, onde não é possível plantar cana de açúcar, e o fato da época de plantio da cana se sobrepor à época de colheita do sorgo, o que permitiria o funcionamento de algumas refinarias durante todo o ano, mesmo quando a cana não está disponível. Isso levaria ao preenchimento de um nicho bastante específico para a cultura do sorgo dentro do setor de produção de biocombustíveis.

Até o momento, processos de domesticação e de melhoramento genético resultaram em variedades de sorgo mais adequadas para a produção de grãos, forragem, silagem, açúcar e fibra. Entretanto, culturas dedicadas à produção de bioenergia, incluindo o sorgo, não foram melhoradas especificamente para o seu total aproveitamento em produção de energia, e por isso pouco se sabe sobre as características relevantes a este sistema ou sobre a genética que controla tais fenótipos (VERMERRIS et al., 2007). Para o melhoramento de sorgo visando à produção de energia, é importante identificar, caracterizar e quantificar a variabilidade genética disponível, bem como definir os fenótipos que sejam favoráveis à produção de etanol de segunda geração. Portanto, todos os recursos ora disponíveis para a espécie devem ser utilizados, como por exemplo uma grande coleção de germoplasma, cujos acessos genéticos estão bem caracterizados do ponto de vista de diversidade genética, possuindo mapas genéticos e físicos integrados; banco de dados de Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequence Tags*, ESTs); e a sequência genômica do sorgo, que foi recentemente finalizada e disponibilizada para a comunidade internacional (PATERSON et al., 2009). A utilização de tais recursos é essencial para a aceleração do melhoramento de sorgo visando à produção de biocombustíveis e energia, uma vez que possibilitará a obtenção de variedades com maior biomassa (maior disponibilidade de matéria-prima para produção de biocombustíveis de segunda geração) ou maior volume de caldo e de açúcares no caldo.

Conclusão

Esta revisão de literatura demonstra que o uso de melhoramento vegetal e técnicas de engenharia genética podem auxiliar na obtenção de materiais de culturas dedicadas à bioenergia que possuam características favoráveis ao pré-tratamento da biomassa e conversão em biocombustíveis, como exemplificado acima pela regulação negativa dos genes da via dos monolignóis. Um método alternativo é o de utilizar a variabilidade genética presente na população de interesse, que apresente expressão diferencial dos genes relacionados à síntese de lignina, bem como o uso de mutantes naturais ou induzidos, como é o caso dos mutantes *brown midrib* presentes em milho e sorgo. Neste caso, o uso de marcadores alelo-específico poderá acelerar o processo de obtenção de germoplasma superior para produção de biocombustíveis.

Referências

- BARRIÈRE, Y.; RALPH, J.; MECHIN, V.; GUILLAUMIE, S.; GRABBER, J. H.; ARGILLIER, O.; CHABBERT, B.; LAPIERRE, C. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability: II. Lessons from brown-midrib mutants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, p. 847-860, 2004.
- BARRIÈRE, Y.; RIBOULET, C.; MÉCHIN, V.; MALTESE, S.; PICHON, M.; CARDINAL, A. J.; LAPIERRE, C.; LÜBBERSTEDT, T.; MARTINANT, J. P. **Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as a model system**. *Genes, Genomes and Genomics*, v. 1, p. 133-156, 2007.
- BAUCHER, M.; BERNARD-VAILHE, M. A.; CHABBERT, B.; BESLE, J. M.; OPSOMER, C.; VAN MONTAGU, M.; BOTTERMAN, J. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 437-447, 1999.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulping. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 38, n. 4, p. 305-350, 2003.

BITTINGER, T. S.; CANTRELL, R. P.; AXTELL, J. D. Allelism tests of the *brown midrib* mutants of sorghum. **Journal of Heredity**, Washington, v. 72, p. 147-148, 1981.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 576-581, 2003.

BOUT, S.; VERMERRIS, W. A candidate gene-approach to clone the sorghum *Brown midrib* gene encoding caffeic acid *O*-methyltransferase. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 269, p. 205-214, 2003.

BUSOV, V. B.; BRUNNER, A. M.; STRAUSS, S. H. Genes for control of plant stature and form. A candidate gene-approach to clone the sorghum *Brown midrib* gene encoding caffeic acid *O*-methyltransferase. **New Phytologist**, Oxford, v. 177, p. 589-607, 2008.

CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in lignin content and composition. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, p. 3-13, 1996.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M.. Structural models of the primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. **The Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting

biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 84, p. 5-37, 2000.

CHEN, F.; REDDY, M. S. S.; TEMPLE, S.; JACKSON, L.; SHADLE, G.; DIXON, R. A. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **The Plant Journal**, v. 48, p. 113-124, 2006.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 759-761, 2007.

CHERNOGLAZOV, V. M.; ERMOLOVA, O. V.; KLYOSOV, A. A. Adsorption of high-purity endo-1,4-beta-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 10, p. 503-507, 1988.

CONVERSE, A. O. Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. In: SADDLER, J. N. (Ed.). **Bioconversion of forest and agricultural plant residues**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 93-105.

DAUWE, R.; MORREEL, K.; GOEMINNE, G.; GIELEN, B.; ROHDE, A.; VAN BEEUMEN, J.; RALPH, J.; BOUDET, A. M.; KOPKA, J.; ROCHANGÉ, S. F.; HALPIN, C.; MESSENS, E.; BOERJAN, W. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. **The Plant Journal**, v. 52, p. 263-285, 2007.

DAVISON, B. H.; DRESCHER, S. R.; TUSKAN, G. A.; DAVIS, M. F.; NGHIEM, N. P. Variation of S/G ratio and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 129/132, p. 427-435, 2006.

DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTTLER S. E.; CHEN H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) lines with reduced lignin contents. **Bioenergy Research**, v. 2, p. 153-164, 2009.

DINUS, R. J.; PAYNE, P.; SEWELL, M. M.; CHIANG, V. L.; TUSKAN, G. A. Genetic modification of short rotation poplar wood properties for energy and fiber production. **Critical Reviews Plant Science**, Boca Raton, v. 20, p. 51-69, 2001.

DRAUDE, K. M.; KURNIAWAN, C. B.; DUFF, S. J. B. Effect of oxygen delignification on the rate and extend of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, Essex, v. 79, p. 113-120, 2001.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S. A.; RIBAK, O.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 9057-9061, 1990.

ESCOVAR-KOUSEN, J. M.; WILSON, D.; IRWIN, D. Integration of computer modeling and initial studies of site-directed mutagenesis to improve cellulose activity on Cel9A from *Thermobifida fusca*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 113, p. 287-297, 2004.

FAO. **Bioenergy**. Roma, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j4313e.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2007.

FILICHKIN, S. A.; DIFAZIO, S. P.; BRUNNER, A. M.; DAVIS, J. M.; YANG, Z. K.; KALLURI, U. C.; ARIAS, R. S.; ETHERINGTON, E.; TUSKAN, G. A.; STRAUSS, S. H. Efficiency of gene silencing in Arabidopsis: direct inverted repeats vs. transitive RNAi vectors. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, p. 615-626, 2007.

FRANKE, R.; HEMM, M. R.; DENAULT, J. W.; RUEGGER, M. O.; HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 30, p. 47-59, 2002.

GAUDILLERE, M.; MONTIES, B. Biochemical and biosynthetic studies on lignification of Gramineae. In: LEWIS, N. G.; PAICE, M. G. (Ed.). **Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 182-192.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v.327, n. 5, p. 455-465, 2004.

GOFF, S. A.; RICKE, D.; LAN, T.-H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D.; MARTIN, C.; KATAGIRI, F.; LANGE, B. M.; MOUGHAMER, T.; XIA, Y.; BUDWORTH, P.; ZHONG, J.; MIGUEL, T.; PASZKOWSKI, U.; ZHANG, S.; COLBERT, M.; SUN, W.-L.; CHEN, L.; COOPER, B.; PARK, S.; WOOD, T. C.; MAO, L.; QUAIL, P.; WING, R.; DEAN, R.; YU, Y.; ZHARKIKH, A.; SHEN, R.; SAHASRABUDHE, S.; THOMAS, A.; CANNINGS, R.; GUTIN, A.; PRUSS, D.; REID, J.; TAVTIGIAN, S.; MITCHELL, J.; ELDREDGE, G.; SCHOLL, T.; MILLER, R. M.; BHATNAGAR, S.; ADEY, N.; RUBANO, T.; TUSNEEM, N.; ROBINSON, R.; FELDHAUS, J.; MACALMA, T.; OLIPHANT, A.; BRIGGS, S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, 2002.

GRESSEL, J.; ZILBERSTEIN, A. Let them eat (GM) straw. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, p. 525-530, 2003.

GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, Limerick, v. 174, p. 246-263, 2008.

GUO, D.; CHEN, F.; INOUE, K.; BLOUNT, J. W.; DIXON, R. A. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-

methyltransferase in transgenic alfalfa. Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 73-88, 2001a.

GUO, D.; CHEN, F.; WHEELER, J.; WINDER, J.; SELMAN, S.; PETERSON, M.; DIXON, R. A. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases. **Transgenic Research**, London, v. 10, p. 457-464, 2001b.

HALPIN, C.; HOLT, K.; CHOJECKI, J.; OLIVER, D.; CHABBERT, B.; MONTIES, B.; EDWARDS, K.; BARAKATE, A.; FOXON, G. A. Brown-midrib maize (/bm1/): a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. **The Plant Journal**, v. 14, p. 545-553, 1998.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, p. 51-58, 1994.

HE, X.; HALL, M. B.; GALLO-MEAGHER, M.; SMITH, R. L. Improvement of forage quality by downregulation of maize O-methyltransferase. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 2240-2251, 2003.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 11206-11210, 2006.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1852-1859, 1998.

HOSOKAWA, M.; SUZUKI, S.; UMEZAWA, T.; SATO, Y. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols du-

ring tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 42, p. 959-968, 2001.

HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 224-229, 2002.

JACQUET, G. **Structure et réactivité des lignines de graminées et des acides phénoliques associés**: développement des méthodologies d'investigation. 1997. Tese (Doutorado) - University Aix, Marseille, France.

JONES, L.; ENNOS, A. R.; TURNER, S. R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 26, p. 205-216, 2001.

KALLURI, U. C.; DIFAZIO, S. P.; BRUNNER, A. M.; TUSKAN, G. A. Genome-wide analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Populus trichocarpa*. **BMC Plant Biology**, v. 7, p. 59, 2007.

KENRICK, P.; CRANE, P. R. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**, London, v. 389, p. 33-39, 1997.

LAPIERRE, C.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. Occurrence of additional monomeric units in the lignins from internodes of a brown-midrib mutant of maize *bm-3*. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie 3 Sciences de la Vie**, Montrouge, v. 307, p. 723-728, 1988.

LI, X.; WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, p. 569-581, 2008.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, p. 113-119, 1998.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLT-ZAPPLE, M.; LADISCH, M. R. Features of promising technologies for

pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 673-686, 2005.

MURRAY, S. C.; SHARMA, A.; ROONEY, W. L.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic improvement of sorghum as a Biofuel Feedstock: I. QTL for stem sugar and grain nonstructural carbohydrates. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 2165-2179, 2008.

NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

OHMIYA, Y.; NAKAI, T.; PARK, Y. W.; AOYAMA, T.; OKA, A.; SAKAI, F.; HAYASHI, T. The role of *PopCel1* and *PopCel2* in poplar leaf growth and cellulose biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 33, p. 1087-1097, 2003.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, p. 65-72, 2004.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; MCCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; RAHMAN, M.-U.; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, p. 551-556, 2009.

PLANO Nacional de Agroenergia 2006-2011. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Embrapa, Secretaria de Gestão Estratégica, 2005. 118 p.

PORTER, K. S.; AXTELL, J. D.; LECHTENBERG, V. L.; COLENBRANDER, V. F. Phenotype, fiber composition, and *in vitro* dry matter disappearance of chemically induced *brown midrib (bmr)* mutants of sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 18, p. 205-208, 1978.

PROVAN, G. J.; SCOBIE, L.; CHESSON, A. Characterisation of lignin from CAD and OMT deficient BM mutants of maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, p. 133-142, 1997.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK JR., W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, Washington, v. 311, p. 484-489, 2006.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; LU, F.; MARITA, J. M.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; BOERJAN, W.; JOUANIN, L. NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into lignins of O-methyltransferase-deficient poplars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 86-91, 2001a.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; MARITA, J. M.; KIMA H.; LUA, F.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S.; CHAPPLEE, C.; FRANKIE, R.; HEMME, M. R.; VAN DOORSSELAERE, J.; SEDEROFF, R. R.; O'MALLEY, D. M.; SCOTT, J. T.; MACKAY, J. J.; YAHIAOUI, N.; BOUDET, A.-M.; PEANJ, M.; PILATE, G.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 993-1003, 2001b.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J. M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S. A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN, W. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29-60, 2004.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, p. 22-27, 2005.

REDDY, M. S.; CHEN, F.; SHADLE, G.; JACKSON, L.; ALJOE, H.; DIXON, R. A. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 16573-16578, 2005.

SABALLOS, A.; VERMERRIS, W.; RIVERA, L.; EJETA, G. Allelic association, chemical characterization and saccharification properties of *brown midrib* mutants of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Bioenergy Research**, v. 1, p. 193-204, 2008.

SABALLOS, A.; EJETA, G.; SANCHEZ, E.; KANG, C.; VERMERRIS, W. A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies *SbCAD2* as the *Brown midrib 6* Gene. **Genetics**, Maryland, v. 181, p. 783-795, 2009.

SATTLER, S. E.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; PEDERSEN, J. F. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. **Plant Science**, Limerick, v. 178, p. 229-238, 2010.

SCHNABLE, P. S.; WARE, D.; FULTON, R. S.; STEIN, J. C.; WEI, F. et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, Washington, v. 326, p. 1112-1115, 2009.

SEWALT, V.; NI, W.; BLOUNT, J. W.; JUNG, H. G.; MASOUD, S. A.; HOWLES, P. A.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of l-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, p. 41-50, 1997.

SHADLE, G.; CHEN, F.; REDDY, M. S. S.; JACKSON, L.; NAKASHIMA, J.; DIXON, R. A. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 1521-1529, 2007.

SHANI, Z.; SHPIGEL, E.; ROIZ, L.; GOREN, R.; VINOCUR, B.; TZFIRA, T.; ALTMAN, A.; SHOSEYOV, O. Cellulose-binding domain increases cellulose synthase activity in *Acetobacter xylinum* and biomass of transgenic plants. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 213-218

SHANI, Z.; DEKEL, M.; TZBARY, T.; GOREN, R.; SHOSEYOV, O. Growth enhancement of transgenic poplar plants by overexpression of *Arabidopsis thaliana* endo-1,4-beta-glucanase (*cel1*) **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 321-330, 2004.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796-815, 2000.

TUSKAN, G. A.; DIFAZIO, S.; JANSSON, S.; BOHLMANN, J.; GRIGORIEV, I.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; RALPH, S.; ROMBAUTS, S.; SALAMOV, A.; SCHEIN, J.; STERCK, L.; AERTS, A.; BHALERAO, R. R.; BHALERAO, R. P.; BLAUDEZ, D. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**, Washington, v. 313, p. 1596-1604, 2006.

VAILHE, M. A. B.; MIGNE, C.; CORNU, A.; MAILLOT, M. P.; GRENET, E.; BESLE, J. M.; ATANASSOVA, R.; MARTZ, F.; LEGRAND, M. Effect of modification of the O-methyltransferase activity on cell wall composition, ultrastructure and degradability of transgenic tobacco. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 72, p. 385-391, 1996.

VERMERRIS, W.; BOON, J. J. Tissue-specific patterns of lignification are disturbed in the *brown midrib2* mutant of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 721-728, 2001.

VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; CARPITA, N. C. Molecular breeding to enhance ethanol

production from corn and sorghum stover. **Crop Science**, Madison, v. 47, S142-S153, 2007. Suplemento.

VIGNOLS, F.; RIGAU, J.; TORRES, M. A.; CAPELLADES, M.; PUIGDOMENECH, P. The *brown midrib3 (bm-3)* mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 407-416, 1995.

VAN WYK, J. P. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, p. 172-177, 2001.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YACOBUCCI, B. D.; SCHNEPF, R. **Ethanol and biofuels: agriculture, infrastructure, and market constraints related to expanded production**. Washington: US Congressional Research Service, 2007.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 86, p. 88-95, 2004.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.-S.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAÍ, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, L. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, Washington, v. 296, p. 79-92, 2002.



Milho e Sorgo

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

